



ISSN 1518-4277

Junho, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## **Documentos 80**

# **Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura**

Rosane Bezerra da Silva  
Edgard Augusto de Toledo Picoli  
Ubiraci Gomes de Paula Lana  
Fernando Hercos Valicente

Sete Lagoas, MG  
2009



Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45  
Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027 1100  
Fax: (31) 3027 1188  
Home page: [www.cnpms.embrapa.br](http://www.cnpms.embrapa.br)  
E-mail: [sac@cnpms.embrapa.br](mailto:sac@cnpms.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino  
Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos  
Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes,  
Paulo Afonso Viana e Clenio Araujo

Revisor de texto: Clenio Araujo  
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro  
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

**1ª edição**

1ª impressão (2009): 200 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

---

Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferente meios de cultura / Rosane Bezerra da Silva ... [et al.]. — Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.

26 p. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277 ; 80).

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. Controle biológico. 3. Genética. I. Silva, Rosane Bezerra da. II. Série.

CDD 632.96 (21. ed.)

---

© Embrapa 2009



## Autores

### **Rosane Bezerra da Silva**

Bióloga MSc. em Biotecnologia Vegetal - (Bolsista)  
Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151  
35701-970 Sete Lagoas, MG [robsl.bio@gmail.com](mailto:robsl.bio@gmail.com)

### **Edgard Augusto de Toledo Picoli**

Eng. Agr. PhD Genética e Melhoramento - (Bolsista pós doutorado)  
Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151  
35701-970 Sete Lagoas, MG [epicoli@ufv.br](mailto:epicoli@ufv.br)

### **Ubiraci Gomes de Paula Lana**

Químico MSc Genética  
Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151  
35701-970 Sete Lagoas, MG  
[ubiraci@cnpms.embrapa.br](mailto:ubiraci@cnpms.embrapa.br)

### **Fernando Hercos Valicente**

Eng. Agr. PhD Controle Biológico e Biologia Molecular  
Embrapa Milho e Sorgo, Cx. Postal 151  
35701-970 Sete Lagoas, MG  
[valicent@cnpms.embrapa.br](mailto:valicent@cnpms.embrapa.br)



## Sumário

Introdução .....	7
Materiais e métodos .....	14
Referências .....	18



# Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura

*Rosane Bezerra da Silva*

*Edgard Augusto de Toledo Picoli*

*Ubiraci Gomes de Paula Lana*

*Fernando Hercos Valicente*

## Introdução

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria do solo, Gram positiva da família *Bacillaceae*, que se caracteriza pela produção de inclusões protéicas cristalinas na fase estacionária do ciclo de crescimento. É uma bactéria que pode ser encontrada em vários substratos como solo, água, superfícies de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (VALICENTE et al., 2000; VALICENTE; BARRETO, 2003; MIRALLES; PÉREZ, 2004). Em 1911, Berliner isolou células de uma bactéria formadora de esporos em lagartas da espécie *Anagasta kuehniella*, uma mariposa que se desenvolve em farinha de trigo (mariposa da farinha). A partir de 1915, em homenagem à província alemã de Thuringia de onde foi isolada, deu-se o nome de *Bacillus thuringiensis*. A mesma bactéria foi posteriormente isolada por Mattes (1927) e, desde então, Berliner e Mattes relataram a patogenicidade deste tipo de bacilo para as larvas de inseto.

A primeira tentativa de teste a campo foi conduzida por Husz (1929) por meio de um programa internacional de controle da



## 8 Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura

lagarta europeia do milho da espécie *Ostrinia nubialis*. Este pesquisador obteve resultados promissores com a cultura da bactéria que havia recebido de Mattes. A partir destes fatos, houve, por parte das indústrias, o interesse no uso de organismos entomopatogênicos.

Em 1938, teve início a comercialização do primeiro produto à base de *B. thuringiensis*. Na década de 1970, já existiam no mercado produtos para o controle de Coleóptera e principalmente Lepidóptera e foi descoberta a variedade *B. thuringiensis israelensis*, eficiente contra larvas de Díptera que revolucionou o controle de insetos vetores de doenças. Posteriormente, variedades tóxicas a nematóides foram descobertas, embora ainda não sejam utilizadas comercialmente (ARANTES et al., 2002).

O *Bt* desenvolve-se em condições aeróbicas em meios artificiais bastante simples. Esta bactéria entra em processo de esporulação durante a fase estacionária, acumulando, assim, proteínas tóxicas denominadas de proteínas Cry codificadas por diversos genes *cry* (YAMAMOTO; DEAN, 2000).

A aplicação de grandes quantidades de produtos à base de *Bt* trouxe a necessidade de um maior entendimento de sua distribuição e do verdadeiro papel deste microorganismo na natureza, o que estimula uma racionalização da sua utilização (ARANTES et al., 2002). Tal conhecimento pode contribuir no desenvolvimento de métodos mais eficientes de isolamento de novas cepas contendo novos genes *cry* ou outros fatores de virulência ainda não conhecidos, importantes para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos com potencial de utilização em programas de controle de pragas (BARRETO, 2005).



O primeiro pesquisador a detectar a presença de cristais em forma de diamante em culturas esporuladas de *Bt* e a relacioná-los com a patogenicidade aos insetos foi Hannay, em 1953. Em 1955, Hannay e Fritz-James desenvolveram métodos para a separação e a posterior análise da proteína cristal, quando obtiveram suspensões intactas, livres de outros materiais, tais como esporos e células vegetativas. Esses tipos de cristais possuíam características de proteínas e, com o estudo morfológico ao microscópio eletrônico, apresentaram estruturas bipiramidal.

Diversas estirpes de *Bt* foram isoladas no mundo inteiro e, atualmente, diversos laboratórios continuam procurando por outras estirpes novas. Hoje se conhecem estruturas de cristais nas formas bipiramidal, cuboidal, romboidal, piramidal, esférica e retangular que podem estar associadas às proteínas que atuam em várias ordens de insetos como Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros, Hemípteros e Orthopteros e contra outros grupos de invertebrados (nematóides, ácaros e protozoários) (EDWARDS et al., 1988; FEILTELSON et al., 1992; CRICKMORE et al., 1995; MEDEIROS et al., 2005).

De acordo com Schnepf et al. (1998), as proteínas Cry possuem três domínios estruturais (I, II, e III), que consistem no centro tóxico ativo. A estrutura de proteínas Cry1Aa (LI et al., 1991), Cry3Aa (GROCHULSKI et al., 1995) e Cry11Bb (GUTIERREZ et al., 2001) sugerem alta similaridade estrutural entre elas e, apesar da baixa homologia entre os aminoácidos, estes domínios estão compreendidos nos primeiros 623 aminoácidos da proteína.

O domínio I está envolvido na inserção da membrana e afeta a função do canal de íons e a toxicidade (WU; ARONSON, 1992; WALTERS et al., 1993; KUMAR; ARONSON, 1999), enquanto o



## 10 Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura

domínio II está envolvido na ligação ao receptor e inserção na membrana e atua na determinação da especificidade da proteína (GE et al., 1989; KNOWLES, 1994; LU et al., 1994). O domínio III é importante para o funcionamento do canal de íons, ligação de receptores e inserção na membrana, estabilidade da proteína e especificidade em relação ao inseto-alvo (BOSCH et al., 1994; MASSON et al., 1994; LEE et al., 1999).

Segundo Lecadet et al. (1999), a susceptibilidade do inseto-praga depende da sua habilidade em digerir as proteínas Cry (protoxinas) para que elas se tornem tóxicas, além do fato das atividades destas toxinas variarem quantitativa e qualitativamente de acordo com a cepa. Ainda segundo estes autores, sabe-se que as proteínas Cry apresentam massa molecular que varia de 40 a 140 kDa.

A patogenicidade e a especificidade de uma cepa são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui. Estes genes codificam para as proteínas sintetizadas na forma de protoxinas. A toxicidade das mesmas está associada ao componente N-terminal, enquanto o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991).

O aparelho digestivo dos insetos apresenta pH alcalino (pH ~ 10); quando os cristais protéicos entram em contato com esse pH são solubilizados, liberando, assim, as protoxinas que, em presença das proteinases (enzimas digestivas), são convertidas em endotoxinas. Os produtos ativos das toxinas se ligam de maneira irreversível aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto, formando poros ou canais iônicos que aumentam a permeabilidade da membrana e causando lise celular; o inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção, o inseto para de se alimentar (HOFTE; WHITELEY, 1989; KNOWLES,





1994; COPPING; MENN, 2000).

Inseticidas à base de *Bt* que têm sido utilizados há mais de 50 anos proporcionam inúmeras vantagens; uma delas é que pode ser considerado um agente biológico de maior potencial para o controle de insetos-praga florestais, agrícolas e vetores de doenças graças à especificidade das d-endotoxinas aos insetos e aos invertebrados-alvo. Outra vantagem é a sua inocuidade aos vertebrados e ao meio ambiente, inclusive insetos benéficos e inimigos naturais (KRIEG; LANGENBRUCH, 1981; MONNNERAT; BRAVO, 2000; CÁRDENAS et al., 2001), fazendo deste agente um componente chave em estratégias de manejo integrado de pragas (BRAVO; QUINTERO, 1993; SCHNEPF et al., 1998). Além disto, pesticidas à base de proteínas Cry têm baixo custo de desenvolvimento e registro em relação a um novo inseticida químico sintético (SCHNEPF et al., 1998).

### **Variabilidade genética dos genes *cry***

Os genes *cry* são classificados de acordo com a sequência de aminoácidos de seus produtos e a especificidade de ação das toxinas. Por este método, foram descritos cinco grupos de genes *cry* diferentes, organizados em algarismos romanos I-V (HOFTE; WHITELEY, 1989). Mas com o avanço da biologia molecular do *Bt*, novos genes *cry* foram e vêm sendo sequenciados e catalogados, dando origem a diversas exceções dentro desta classificação. Crickmore et al. (1998) propuseram a nova classificação baseada somente na sequência de aminoácidos codificada pelos genes, não levando em consideração o perfil de toxicidade.

O número de cópias dos genes *cry* presente em uma determinada cepa de *Bt* pode influenciar de maneira



## 12 Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura

significativa na quantidade final da proteína produzida pela bactéria. As cepas de *Bt* têm um grande potencial adaptativo em termos de inseto-alvo decorrente desta multiplicidade e da diversidade dos cristais protéicos inseticidas. A associação de processos de conjugação e transposição dos genes *cry* seria responsável por tal diversidade (GONZÁLES et al., 1982; LERECLUS et al., 1982; SANCHIS et al., 1988; AGUIAR, 2007). Vários genes que codificam para a proteína cristal fazem parte de uma estrutura complexa, a qual inclui vários elementos genéticos móveis, como transposons e IS (*Insertion Sequences*) (KRONSTAD; WHITELEY, 1984; LERECLUS et al., 1984).

Algumas estirpes de *Bt* apresentam um único gene codificador das proteínas Cry, como a cepa *kurstaki* HD73, que contém somente o gene *cry1Ac* localizado em um único plasmídio de 50MDa (LERECLUS et al., 1993). Outras estirpes apresentam genes diferentes, como é o caso da cepa *aizawai* 7.29, que contém cinco genes, quatro deles localizados no cromossomo ou megaplasmídios e um quinto em um plasmídio de 45MDa (SANCHIS et al., 1988). Já a subespécie *israelensis* apresentou cinco genes codificadores da d-endotoxina e outro gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um único plasmídeo de 72MDa (BOURGOUIN et al., 1988).

Os genes que codificam as proteínas Cry encontram-se nos cromossomos ou em plasmídeos de diversos tamanhos (4-150 MDa), não somente em combinações distintas ou várias cópias dentro de um plasmídeo, mas também por combinações de plasmídios presentes nas diversas cepas de *B. thuringiensis* (LERECLUS et al., 1993).



## Plasmídeos

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossomais encontrados em várias espécies de bactérias e em algumas leveduras. As moléculas de DNA plasmidial são circulares e dupla-fita. Comparável ao cromossomo bacteriano, os plasmídeos têm a habilidade de replicação autônoma e possuem genes ativos. Adicionalmente, durante a divisão celular observa-se a segregação de pelo menos uma cópia do plasmídeo para cada célula. Na natureza, alguns plasmídeos apresentam incompatibilidade funcional com outros plasmídeos similares, o que impede a residência simultânea na célula (BIRGE, 1994).

Um plasmídeo padrão parece estar relacionado com cada estirpe de acordo com o sorotipo ou qualquer outro grupo específico. Os plasmídeos padrões são divididos em dois grupos diferentes - os menores que 30MDa e os maiores que 30MDa. Essa diferença pode ser claramente notada quando as amostras são aplicadas em gel de agarose. Os plasmídeos menores ficam abaixo do DNA cromossomal, enquanto que os chamados megaplasmídeos ficam acima. Em bactérias Gram positivas, os plasmídeos menores estão presentes em maiores quantidades; mas ainda não se sabe ao certo qual a específica função dos mesmos. Quanto aos megaplasmídeos, são abrigos dos genes *cry* e a quantidade destes genes pode variar de acordo com cada plasmídeo, podendo apresentar apenas um único gene ou vários em um mesmo plasmídeo (BERRY et al., 2002; LOEZA-LARA et al., 2005; ROH et al., 2007).

Em função da importância dessas moléculas nas células hospedeiras e de seu uso como ferramentas moleculares, várias técnicas para a extração e a purificação dos plasmídeos têm sido otimizadas (GITAHY et al., 2005).



## 14 Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura

A técnica mais utilizada é a extração por lise alcalina e a purificação por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio (SAMBROOK, 1989), sendo um dos primeiros métodos bioquímicos desenvolvidos e podendo ser utilizado para obtenção de plasmídeos de vários microrganismos (GITAHY et al., 2005). Essa técnica, apesar de vários ajustes, continua sendo demorada e trabalhosa, além do que possui um alto nível de contaminação pela utilização do brometo de etídio. Ramirez e Ibarra (2008) desenvolveram um novo protocolo para *Bacillus thuringiensis*, mais prático e rápido na obtenção do padrão plasmidial.

No trabalho de Ramirez e Ibarra (2008), o meio de cultura utilizado para a fermentação da bactéria foi o meio Spizizen. Mas quando se trabalha em larga escala, o meio de cultura para fermentação é geralmente preparado usando um dos meios padronizados pelos grandes laboratórios para isolar microrganismos ou promover o crescimento das bactérias. No laboratório de controle biológico da Embrapa Milho e Sorgo, o meio de cultura (líquido ou sólido) padronizado para obtenção do crescimento de *Bt* é o LB (Lurian Bertani) enriquecido com sais. Baseado nesse critério, o meio LB sais também foi utilizado neste trabalho para verificar a qualidade e a eficiência do mesmo na extração plasmidial de cepas de *Bt* quando comparado com o meio Spizizen sugerido por Ramirez e Ibarra (2008).

## Materiais e métodos

### Extração de plasmídeos

Quatro cepas de *Bt* foram utilizadas neste trabalho, sendo a cepa HD73 (*Bt kustaki*) pertencente ao USDA (United States Department of Agriculture), a cepa T09 (*Bt tolworthi*)



pertencente ao Instituto Pasteur e as cepas 344 (*Bt tolworthi*) e 1644 (sem identificação de subespécie) pertencentes à Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 1). As cepas citadas são armazenadas em glicerol em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A extração plasmidial foi feita de acordo com Ramírez e Ibarra (2008), com algumas modificações. Uma pequena amostra de cada cepa foi inoculada em 50 mL dos seguintes meios:

*Meio de cultura Spizizen*: 0,2%  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ; 1,4%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,6%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1% citrato de sódio; 0,02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , suplementado com 0,5% glicose, 0,1% ácido casamino e 0,01% extrato de levedura.

*Meio de cultura LB saís (Lurian Bertani)*: 0,1% glicose; 0,8% caldo nutritivo; 0,5% extrato de levedura; 0,03%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1% triptona; 0,002%  $\text{FeSO}_4$ ; 0,002%  $\text{ZnSO}_4$ ; 0,002%  $\text{MnSO}_4$ , e 0,5% de NaCl.

As amostras foram colocadas sob agitação de 250 rpm a  $28^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 16 horas. Após o período de crescimento, foi verificada a densidade óptica de cada amostra a 600 nm. As amostras foram centrifugadas (Sorvall® Super T21) a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos a 13.020 rpm. O pellet foi ressuscitado em 20 mL de tampão TES (30 mM Tris base; 5 mM EDTA; 50 mM NaCl; pH 8,0), seguido de centrifugação nas mesmas condições acima.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 2 mL de tampão de lise (tampão TES, 20% sacarose, 2 mg/mL lisozima e 1  $\mu\text{L/mL}$  de RNase na concentração de 10 mg/mL) e incubado em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos. Após o banho maria, foi adicionada a cada amostra 3 mL de SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) e incubado a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Em seguida, 1,5 mL de acetato de sódio 3M (pH 4.8) foi adicionado às amostras, que



## 16 Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura

foram incubadas a -20 °C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4 °C por 20 minutos a 13.020 rpm. Foram adicionados a esta suspensão 12 mL de etanol absoluto, sendo incubado overnight a -20 °C seguido de centrifugação por 20 minutos nas mesmas condições. Os pellets formados foram diluídos em 100 µL de TE (Tris-EDTA pH 8,0) e armazenados a -20 °C.

### Eletroforese

Para a visualização do perfil plasmidial, 10 µL de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 0,5% em cuba horizontal. O tampão TAE (0,001 M EDTA pH 8,0; 0,04 M TRIS pH 8,0; 0,02 M ácido acético) foi utilizado tanto para confecção do gel quanto para corrida por aproximadamente 4 horas a 100 V. Após a eletroforese, o gel foi tratado em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por aproximadamente 15 minutos e descorado em água por aproximadamente 30 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo fotodocumentador Gel Logic 200 Imaging System.

### Eficiência na extração plasmidial

O meio LB proporcionou um melhor crescimento das cepas de *Bt* avaliadas; essa diferença pode ser verificada com a leitura da OD (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valor da densidade óptica das cepas de *Bt* nos diferentes meios de cultura

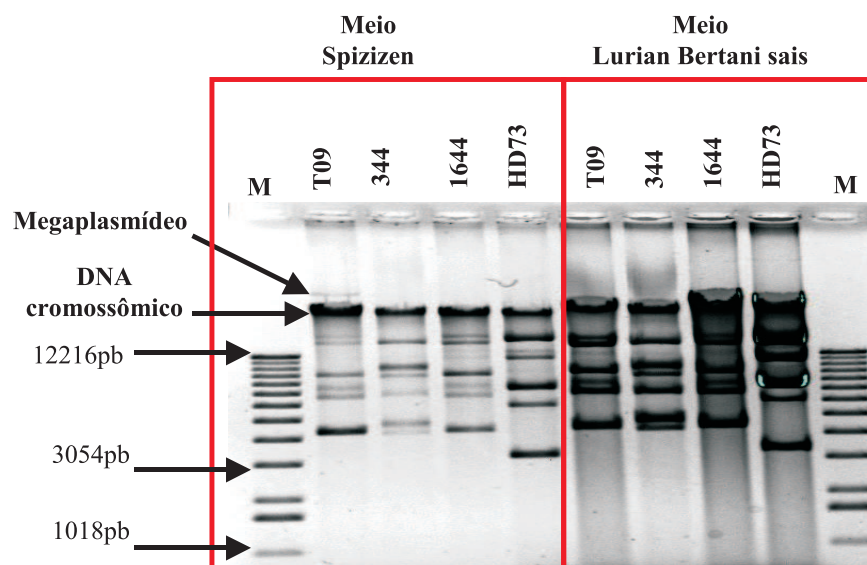
CEPAS BT	OD <sub>600nm</sub>	
	MEIO Lurian Bertani saís	MEIO Spizizen
344	2,13	1,93
1644	2,15	1,98
T09	2,18	1,92
HD73	2,12	1,00



Já é de conhecimento geral que os microrganismos necessitam de minerais para seu crescimento e para a formação de produtos metabólicos. Para o crescimento de *Bt*, há a necessidade de altos níveis de carbono (glicose), nitrogênio (ácido casamino e extrato de levedura) e oxigênio (LIMA, 2001). Segundo Içgen et al. (2002) e Lecadet et al. (1980), os sais proporcionam a formação do cristal protéico e o tamponamento do meio, o que também auxilia no crescimento dessa bactéria.

No gel de agarose, é possível visualizar a qualidade do perfil plasmidial com os dois meios (Figura 1). Os isolados que foram cultivados em meio LB enriquecido com sais apresentaram bandas mais espessas, o que dificultou a contagem do número de plasmídeos. Foram feitas diluições deste material (1, 5 e 10 vezes) com o objetivo de melhorar a qualidade apresentada em gel de agarose, mas não se obteve sucesso (resultado não apresentado). Algumas amostras continuaram com a mesma qualidade ou ainda não apresentaram bandas, ou seja, não apresentaram um padrão na qualidade visual em gel de agarose. Já as amostras cultivadas em meio Spizizen resultaram em um perfil mais fácil de ser avaliado, sendo possível a contagem dos mesmos.

A amostra T09 extraída com o meio Spizizen apresentou um megaplasmídeo. Não foi possível a visualização da mesma amostra extraída com o meio LB acrescido de sais, nem mesmo quando feitas as diluições. Baseado nesse resultado, o meio Spizizen (RAMIREZ; IBARRA, 2008) mostrou uma melhor qualidade na extração de plasmídeos e de megaplasmídeos, sendo o meio de cultura mais indicado entre os dois meios testados para extração de um maior número de cepas de *Bt*.



**Figura 1.** Perfil plasmidial em gel de agarose 0,5 % e a qualidade visual apresentada pelos meios de cultura Spizizen e LB sais. M (Marcador molecular 1 Kb Invitrogen)

## Referências

- AGUIAR, R. W. S. **Estudo da toxicidade de proteínas (Cry) recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado e baculovírus e células de inseto.** 2007. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BOÂS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégia no controle biológico. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotechnologia: avanços na agricultura e agroindústria.** Caxias do Sul: EDUSC, 2002. p. 269-293.





BARRETO, M. R. **Prospecção e caracterização de genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para controle de insetos-pragas da cultura da soja.** 2005. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BERLINER, E. Ueber die Schlattsucht der Mehlmotenraupe. **Gesamte Getreidewesenm**, v. 25, p. 3160-3162, 1911.

BIRGE, E. A. **Bacterial and bacteriophage genetics.** New York: Springer-Verlag, 1994. 45 p.

BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEN-DOV, E.; JONES, A. F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; HOLDEN, M. T. G.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. **68**, n. **10**, p. 5082-5095, Oct. 2002.

BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 3575-3583, 1988.

BOSCH, D.; SCHIPPER, B.; KLEIJ, H. van der; MAAGD, R. A. de; STIEKEMA, W. J. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistant management. **Biotechnology**, New York, v. 12, p. 915-919, 1994.

BRAVO, A.; QUINTERO, R. **Importancia y potencial del *Bacillus thuringiensis* en el control de plagas.** Santiago: Oficina regional de la FAO para America Latina y el Caribe, 1993. 30 p.

CÁRDENAS, M. I.; GALÁN-WONG, L.; FERRÉ-MANZANERO, J.; PEREYRA-ALFÉREZ, B. Selección de toxinas *cry* contra



20 Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura

*Thichoplusia ni*. **Ciencia Uanl**, Monterrey, v. 4, n. 1, p. 51-62, 2001.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action,

applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, p. 651-676, 2000.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; LAMBERT, B.; ERECLUS, D.; GAWRON-BURKE, C.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis cry* genes. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 28., 1995, Ithaca. **Abstracts**. Ithaca: Cornell University, 1995. p. 14.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crustal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

EDWARDS D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **European Patent Application**, p. 303-426, 1988.

FEILTELSON J. S.; PAYNE J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Biotechnology**, New York, v.10, n. 3, p. 271-275, 1992.

GE, A. Z.; SIVAROVA, N. D.; DEAN, D. H. Location of the *Bombyx mori* specificity domain of *Bacillus thuringiensis* d - endotoxin protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 86, n. 11, p. 4037-4041, June 1989.



GITAHY, P. M.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. L. S.; SOUZA, M. T.; BALDANI, J. I. **Purificação de DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio**. Seropédia: Embrapa Agrobiologia, 2005. 20 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8).

GONZÁLES, J. M. J.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 79, p. 6951-6955, 1982.

GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J. L.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 254, n. 3, p. 447-464, Dec. 1995.

GUTIERREZ, P.; ALZATE, O.; ORDUZ S. A theoretical model of the tridimensional structure of *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin cry 11Bb toxin deduced by homology modelling. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 3, p. 357-364, 2001.

HANNAY, C. L. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. **Nature**, London, v. 172, n. 4387, p. 1004-1005, 1953.

HANNAY, C. L.; FRITZ-JAMES, P. C. The protein Crystal of *Bacillus thuringiensis*. **Canada Journal Microbiology**, Ottawa, v. 1, n. 8, p. 694-710, 1955.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Inseticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.



22 Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura

HUSZ, B. On the use of *Bacillus thuringiensis* in the fight against the corn borer. **Institute Corn Borer Investment Science Reporter**, v. 2, p. 99-110, 1929.

IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; OZCENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. **Research in Microbiology**, Paris, v. 153, n. 9, p. 605-609, Nov. 2002.

KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G. A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p. 837-896.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, London, v. 24, p. 275-308, 1994.

KRONSTAD, W.; WHITELEY, H. R. Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 160, n. 1, p. 95-102, Jan. 1984.

KUMAR, A. S. M.; ARONSON, A. I. Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 19, p. 6103-6107, Oct. 1999.

LECADET, M. M.; BLONDEL, O.; RIBIER, J. A semi-defined medium for growth and sporulation in *Bacillus thuringiensis* Berliner and many other strains. **Journal of General Microbiology**, London, v. 121, n. 11, p. 203-212, Nov. 1980.

LECADET, M. M.; FRACHON, E.; DUMANOIR, V. C.; RIPOUTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P.; THIERY, I. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 660-672, Apr. 1999.



LEE, M. K.; YOU, T. H.; GOULD, F. L.; DEAN, D. H. Identification of residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4513-4520, Oct. 1999.

LERECLUS, D.; LECADET, M. M.; RIBIES, J.; DEDONDER, R. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. **Molecular and General Genetics**, Washington, v. 186, p. 391-398, 1982.

LERECLUS, D.; RIBIER, J.; Klier, A.; MENOU, G.; LECADET, M. M. A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 3, n. 11, p. 2561-2567, Nov. 1984.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: J. Wiley, 1993. p. 37-70.

LI, J. D.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, New York, v. 353, n. 6347, p. 815-821, Oct. 1991.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3, p. 593.

LOEZA-LARA, P. D.; BENINTENDE, G.; COZZO, J.; OCHOA-ZARZOSA, A.; BAIZABAL-ZGUIRRE, V. M.; VALDE-ALARCÓN, J. J.; LÓPEZ-MEZA, R. The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates



24 Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura

by the Rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. **Plasmid**, v. 54, p. 229-240, 2005.

LU, H.; RAJAMOHAN, F.; DEAN, D. H. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin CryIA(a) associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 17, p. 5554-5559, Sept. 1994.

MASSON, L.; MAZZA, A.; GRINGORTEN, I.; BAINES, D.; ANELIUNAS, R.; BROUSSEAU, R. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 851-860, Dec. 1994.

MEDEIROS, P. T.; FERREIRA, M. N.; MARTINS, E. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; DIAS, J. M. C. S.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-ceucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1145-1148, 2005.

MIRALLES, M. P.; PERES, V. J. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A.; CERON, J. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis* em el control biológico**. Bogotá: [s.n.], 2004. p. 207-232.

MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, p. 163-200.

RAMÍREZ, R.; IBARRA, J. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. **Applied and Environmental**



**Microbiology**, Washington, v. 74, n. 1, p. 125-129, Jan. 2008.

ROH, J. Y.; CHOI, J. Y.; LI, M. S.; JIN, B. R.; HOJE, Y. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 17, n. 4, p. 547-559, Apr. 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENOU, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis* aizawai 7.29. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 311-331, 1988.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p. 775-806, 1998.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R.; VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PAIVA, E. Identificação através de PCR dos genes *CryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 147-153, mar. 2000.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* Survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 639-644, Oct./Dec. 2003.



26 Qualidade na extração plasmidial de *Bacillus thuringiensis* com diferentes meios de cultura

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.).

**Entomopathogenic bacteria:** from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 81-100.

WU, D.; ARONSON, A. I. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin involved in toxicity and specificity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, p. 2311-2317, Feb. 1992.

WALTERS, F. S.; SLATIN, S. L.; KULESZA, C. A.; ENGLISH, L.H. Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 196, n. 2, p. 921-926, Oct. 1993.